

転写活性化因子HTLV-Ip40taxにより特異的に誘導される膜糖蛋白, gp34のcDNAクローニングとその解析

著者	三浦 成人
号	1066
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/20460

論文内容要旨

Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I) はadult T-cell leukemia (ATL), HTLV-I associated myelopathy (HAM) の原因virusである。HTLV-I由来の蛋白質の一つp40^{int}は細胞トランスフォーメーション活性を持ち、また種々の遺伝子を転写活性化する。現在までp40^{int}はインターロイキン2 (IL-2) 及びその受容体 (IL-2R) α 鎖, c-fosなど細胞の増殖分化に関与する遺伝子群を活性化することが明らかにされていることから、p40^{int}が細胞を正常な増殖分化から逸脱させ癌化へ導くものと考えられている。従って、p40^{int}の標的遺伝子の構造と機能、さらにp40^{int}による転写活性化機構を解析することがATL, HAMの病因解明に重要であると考えられる。

gp34は種々の血液系細胞及び細胞株のうちHTLV-I発現細胞においてのみ発現が認められる34kdの膜糖蛋白質であり、これまで単クローン抗体を用いて同定されてきたが、その由来は不明であった。我々はp40^{int}発現誘導可能な細胞株JPX-9を用い、gp34はp40^{int}により誘導される細胞遺伝子産物であることを先ず証明した。JPX-9細胞にp40^{int}発現を誘導させるとgp34の発現が認められた。さらにp40^{int}とgp34の二重染色を行うとgp34陽性細胞は全てp40^{int}も発現しており、p40^{int}発現のない細胞にはgp34の発現を認めないことが分かり、p40^{int}が細胞内でgp34の発現を誘導していると考えられた。

次にp40^{int}によるgp34の転写活性化機構を調べるために、gp34cDNAクローニングを行った。HTLV-I及びgp34陽性細胞であるMT-2より、発現ベクターCDM8を用いてcDNAライブラリーを作製した。これをCOS-1細胞に導入し、gp34発現細胞クローンを抗gp34単クローン抗体によるパンニング法で得た。このクローンは約1 kbpで552bpの読み枠を持ち、分子量21,016の蛋白質をコードし得ることが分った。即ち、gp34より糖鎖を除いたペプチド部分の大きさ約22kdとほぼ一致した。N末には典型的なシグナルペプチド配列はなく、27個の疎水性アミノ酸から成る配列が一カ所見られ膜貫通部と考えられた。さらにこの膜貫通部のC末側に4カ所のN-グリコシド結合配列がみられたことから、gp34分子はC末側を細胞外へ出した構造をとっていると考えられた。次にgp34陰性細胞であるJurkat細胞にこのcDNAクローンを導入すると細胞は抗gp34単クローン抗体が認識する34kdの蛋白質を発現した。以上より、得られたcDNAクローンがgp34をコードしていることが確認された。Southern blotによりgp34遺伝子はゲノム中に1コピー存在することが分った。また、Northern hybridizationにより2種のgp34mRNA (1.3kbと3.7kb) が存在することが分ったが、さらに約3.3kbのcDNAクローンを得て解析したところ、この二種のmRNAはそれぞれ異った部位のポリA付加シグナル (AATAAA) を用いていることが示唆された。

種々の細胞、細胞株を用いて調べたところ、gp34mRNAはHTLV-I発現細胞でのみ発現しており、抗gp34単クローン抗体での解析の結果と一致した。ヒト末梢白血球をPHA刺激してもgp34mRNAの発現は誘導されず、IL-2R α 、c-fosなどと異なる転写機構を持つことが示唆された。次にJPX-9細胞においてp40^{tax}発現誘導前後でのgp34mRNA発現を調べた。p40^{tax}及びIL-2R α mRNA発現は誘導後24時間ですでに最大に達しその後次第に減少した。これに比しgp34mRNA発現は誘導後48時間より認められ96時間においてもむしろ若干増加した。このことはp40^{tax}が転写レベルでgp34発現を活性化していることを示すと共に、その転写活性化が従来のp40^{tax}によるIL-2R α 、c-fos、HTLV-I等の転写活性化とは全く異なる機構によって担われていることを示している。即ち、p40^{tax}によるgp34遺伝子の転写活性化機構はNF-KBやCRE結合蛋白を介した機構とは異なるものと推察される。さらに、これまでのp40^{tax}の標的遺伝子群は全て抗原刺激などの生理的刺激によっても転写活性化されることが分っているが、gp34はp40^{tax}によってのみ特異的に活性化される。この点からもgp34遺伝子の転写活性化機構が他と異なることが示唆され、今回の我々の実験事実とも合致する。

gp34分子の生物学的意義は不明であるが、その発現が強い制御下にあること、また膜糖蛋白質であることから、細胞の増殖、分化あるいは機能発現において何らかの重要な役割を担っている可能性が考えられる。今後gp34の正常組織等における発現を詳細に解析することによってその意義を明らかにしたい。

以上、今回の研究において、我々はgp34がp40^{tax}により転写活性化される細胞遺伝子産物であることを示し、さらにgp34cDNAのクローニングを行い、その塩基配列を決定し報告した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、成人T細胞白血病（ATL）の原因ウイルスであるHuman T cell leukemia virus type I（HTLV-I）が感染している細胞に特異的に認められる膜糖蛋白質（gp34）の遺伝子単離と、その性状を解析した論文である。

HTLV-I はATLばかりでなく、HTLV-I 関連ミエロパチーの原因ウイルスでもある。これら疾病の成立機序は未だ不明な点が多いが、少なくとも疾病の初期においてHTLV-I p40^{int}の関与が指摘されている。p40^{int}は細胞内で転写促進因子として働き、自分自身の遺伝子ばかりでなく種々の細胞遺伝子を活性化する。それら遺伝子の異常発現によってこれら疾病が誘起されると考えられる。従って、p40^{int}の作用を種々の角度から解析することは、発症機構を理解する上で重要である。

gp34はHTLV-I 陽性細胞のみにその発現が認められる膜抗原であることが、単クローン抗体を用いた実験により示されていた。しかし、gp34がウイルス遺伝子由来なのか細胞遺伝子由来なのかは不明であった。本論文では、先ずgp34が細胞由来の遺伝子であること、さらにその発現がp40^{int}により特異的に誘導されることをp40^{int}発現誘導可能な細胞株を用いて証明している。このことは、gp34遺伝子が新たなHTLV-I p40^{int}標的遺伝子であることを示している。この新しい標的遺伝子の構造と機能を解析し、またp40^{int}の作用機序を解明するためには同遺伝子の単離が不可欠である。本論文ではgp34に対する抗体を用いたパンニング法でgp34 cDNA単離に成功している。得られたcDNAは、552bpから成り183個のアミノ酸からなる翻訳可能領域をもつ。アミノ酸配列から予想される分子量は21,016で、これは糖鎖を除いたgp34のペプチド部分の大きさ約22kDと良く一致する。gp34はN末端側近くに27アミノ酸からなる膜貫通部を持つが、典型的なシグナルペプチドはない。膜貫通部よりC末端側に糖鎖結合部位が存在することからgp34はC末端を細胞外に出す糖蛋白分子と考えられる。ハイブリダイゼーション実験から、gp34遺伝子はヒトゲノム中に1コピー存在する。さらに、gp34遺伝子から蛋白コーディング領域を共有する2種のmRNAが転写されることを明らかにしている。p40^{int}によるgp34遺伝子発現の誘導は転写レベルの現象であることを証明し、その時間経過がp40^{int}の作用を受ける他の細胞遺伝子（インターロイキン2受容体 α 鎖、c-fos）の場合とは異なることも示している。これらの結果は、p40^{int}が従来知られていた転写シグナル伝達系とは異なる伝達系にも作用している可能性を示しており、興味深い。

p40^{int}の新たな標的遺伝子を単離し、その解析を行なったことは、p40^{int}の転写活性化機構の解明に重要であるばかりでなく、HTLV-I が招来する様々な病態との関連も考え合わせ、HTLV-I 研究に大きく寄与すると思われる。従って本論文は博士号授与に値する研究とみなす。